Archive of SID

بررسی نقش آمینواسیدهای اطراف توالی جایگاه فعال در فعالیت آنزیم کیتیناز باکتری *Serratia marcescens* B4A

زینب امروزی توبکانلو[۱]، سعید امین‌زاده[۱*]، علی‌اصغر کارخانه‌ای[۱] و جهان علی خواجه[۲]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، گروه مهندسی زیست فرآیند

[۲] نیویورک، سیتی کالج، دپارتمان شیمی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۲۱

چکیده

کیتینازها یکی از آنزیم‌های صنعتی مهم محسوب می‌شوند که از اهمیت به سزایی در خصوص تجزیه مواد کیتینی، پاکسازی محیط زیست و کنترل قارچ‌های پاتوژن گیاهی و آفات دارند که با شکستن اتصالات گلیکوزیدی β-1,4 سبب تجزیه کیتین می شوند. این آنزیمها در ساختار خود دارای دمین کاتالیتیکی $(\beta/\alpha)_8$ حاوی توالیهای حفاظت شده‌ای به نام موتیف DXDXE روی رشته β_4 هستند که آسپارتات و گلوتامات موجود در این توالی و همچنین آمینواسیدهای موجود در اطراف این توالی نقش اصلی در فرآیند هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی بازی می‌کنند. بررسی آمینو اسیدهای نزدیک به جایگاه فعال می تواند به درک نقش آنها در فرآیند کاتالیز کمک کند. در این پروژه به منظور بررسی نقش گلیسین ۱۹۱ و سرین ۳۹۰ موجود در اطراف توالی حفاظت شده در فرآیند کاتالیتیکی کیتیناز *Serratia marcescens* B4A، این دو آمینواسید جهش داده شدند و پس از همسانه‌سازی در حامل بیانی و بررسی بیان آن با SDS-PAGE، اثر این دو جهش بر روی فعالیت آنزیم مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: کیتیناز، کیتین، اتصالات گلیکوزیدی، *Serratia marcescens* B4A

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۲ پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

مقدمه

کیتین $(C_8H_{13}O_5N)_n$ یک هموپلی‌ساکارید حاوی نیتروژن با زنجیره‌ی طویل N–استیل گلوکز آمین (یک مشتقی از گلوکز) دارای اتصالات گلیکوزیدی β-1,4 است که توسط پیوندهای هیدروژنی به صورت یک ساختمان کریستالی منظم و نامحلول درآمده است. کیتین از لحاظ تکاملی یک میلیون سال پیش آغاز شده، موقعی که اولین قارچ تک سلولی از ارگانیسمهای دیگر جدا شد (۱۰). کیتین اسکلت خارجی حشرات و پوسته سخت‌پوستان را می‌سازد. علاوه بر آن در دیواره سلولی قارچها نیز وجود دارد (۷). کیتیناز گلیکوزیل‌هیدرولازهایی هستند که برای اولین بار در سال ۱۹۱۱ شناسایی شد؛ زمانی که برنارد (Bernard) نشان داد که یک فاکتور حساس به حرارت و ضد قارچ در گیاه ارکیده وجود دارد. با توجه به نحوه شکسته شدن رشته کیتین، آنزیمهای کیتیناز در دو گروه اندوکیتینازها و اگزوکیتینازها قرار می‌گیرند. آنزیم کیتیناز اهمیت اقتصادی چشمگیری در خصوص تجزیه مواد کیتینی و پاکسازی محیط زیست و تهیه مواد پیش ماده و کنترل قارچهای پاتوژن گیاهی و آفات دارد (۷). یکی از ابزارهای قدرتمند در مطالعه عملکرد میکروارگانیسم‌ها در حین بیماریزایی تراریختی است و قارچهای رشته‌ای از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که به این منظور مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱) همچنین می‌توان با ساخت سازه‌های بیانی گیاهی حاوی ژن کیتیناز و انتقال آن به گیاه، گیاه تراریخته‌ای ایجاد کرد که به بیماریهای قارچی مقاوم است (۲). بررسی ساختار گلیکوزیل‌هیدرولازهای خانواده ۱۸ (GH18)وجود سه زیرساختار شامل توالی سیگنال (s)،

www.SID.ir

Archive of SID

دمین کاتالیتیکی $(\beta/\alpha)_8$ گلیکوزیل‌هیدرولاز ۱۸ (CAT) به همراه دمین متصل‌شونده به کیتین (CH) و دمین مشابه فیبرونکتین نوع III را بطور دقیق مشخص نمود (۷). جایگاه اتصال سوبسترا یک شکاف طویلی است که از بالای زنجیر (barrel) عبور کرده و شامل آمینواسیدهای آروماتیکی است که با هر واحد N–استیل گلوکز آمین در زنجیره کیتین به طور هیدروفوبیکی جمع شده است (۳). علی رغم تنوع ساختاری در کیتینازها، یک توالی نشانه بسیار حفاظت‌شده به نام موتیف DXDXE روی رشته β_4 شناسایی شده است که در این موتیف گلوتامات (E) به عنوان دهنده پروتون کاتالیتیک عمل می‌کند و آسپارتات دوم(D_2) برای شرکت در پایداری واپیچش ضروری سوبسترا در معرض قرار می‌گیرد (۱۹). هیدرولیز پیوند گلیکوزیدی توسط دو باقی مانده آمینواسیدی آنزیمها، یعنی یک اسید عمومی(دهنده پروتون) و یک باز کاتالیز می‌شود (۸). در کیتینازهای خانواده ۱۸ فرآیند هیدرولیز از طریق مکانیسم نگهداشتن جابه جایی دوتایی (Double-Displacement Retaining Mechanism) انجام می‌شود که در آن اکسیژن پیوند گلیکوزیدی β-1,4 ابتدا پروتونه می-شود (تشکیل یک یون حدواسط به نام یون اکسوکربونیوم می‌دهد)، این یون حدواسط به وسیله دومین گروه کربوکسیل پایدار می‌شود (با تعاملات کووالانی یا الکتروستاتیکی). در نهایت با حمله نوکلئوفیلی مولکول آب، محصول واکنش آزاد می‌گردد که این حمله برای نگهداشتن کنفورماسیون آنومریک اولیه لازم می‌باشد (۶ و ۱۶) در پایگاه CAZypedia نتایج استروشیمیایی واکنش کاتالیتیکی و نوع بقایای آمینو اسیدی که به صورت نوکلئوفیل یا دهنده پروتونی عمل می‌کنند نشان داده شده است و اطلاعاتی در مورد مکانیسمهای کاتالیزوری و تنوع گلیکوزیدهیدرولازها در اختیار قرار داده است. گروهی از محققین دریافتند که سرین اطراف نواحی حفاظت شده جایگاه کاتالیتیکی برای عمل کاتالیتیکی کیتینازهای خانواده ۱۸ مهمند (۱۷ و ۲۲). علاوه بر آن گروهی دیگر از محققان دریافتند که آمینواسیدهای پرولین، سرین، ترئونین، آلانین و گلیسین به واسطه قرار گرفتن در قطعات ارتباط دهنده (Linker) در فرآیندهای کاتالیتیکی کیتینازها نقش به سزایی ایفاء می‌کنند (۱۴). در پژوهش حاضر با روش جهش‌زایی هدفمند نقش سرین ۳۹۰ و گلیسین ۱۹۱ در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز *Serratia marcescens* B4A مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد: پلاسمید pQE60 حاوی ژن کیتیناز به عنوان الگو برای جهش ژن کیتیناز استفاده شد و سویه DH5α (Invitrogen)از باکتری *Escherichia coli* به عنوان یک میزبان برای همسان‌سازی مولکولی پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T (Fermentas) و pET26b (Fermentas) حامل ژن کیتیناز طبیعی و جهش‌یافته و سویه BL21 (DE3) (Invitrogen)از باکتری *Escherichia coli* برای بیان پروتئین استفاده شد و کیتین پوسته خرچنگ و ۵/۳ دی نیتروسالیسیکلیک اسید (DNS) از سیگما (St. Louis, MO, USA) خریداری شد و کیتین کلوئیدی از کیتین تجاری طبق روش روبرت و سلیترنیکوف (۱۸) تهیه شد.

مطالعات بیوانفورماتیکی: به منظور انجام مطالعات بیوانفورماتیکی، پیشگویی ساختار پروتئین و طراحی پرایمرهای اختصاصی جهت ایجاد جهش در اطراف نواحی حفاظت شده دمین کاتالیتیکی، ابتدا ژن کیتیناز *S. marcescens* B4A از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با شماره دسترسی HM473183 در GeneBank گرفته شد (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) و دمین کاتالیتیکی و نواحی حفاظت شده آن مورد بررسی قرار گرفت (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?ascbin=8&maxaln=10&seltype=2&uid=119365) (۴). مطالعه نرم‌افزاری تأثیر جهشها بر ساختار کلی کیتیناز با مطالعه ساختمان سوم آنها به روش همولوژی بر اساس ساختار باز کیتیناز *S. marcescens* (PBD ID, 1edq_A)،

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد. به همین منظور ساختمان سوم کیتینازهای نوترکیب طبیعی و جهش‌یافته براساس مدل همولوژی با استفاده از سرور MODELLER v9.10 (http://www.salilab.org/modeller/) (۹) پیشگویی گردید. سپس کیتینازهای جهش‌یافته بر روی کیتیناز طبیعی منطبق شدند. میزان RMSD (فاصله rmsd) بین اتمهای دو مولکول مربوط به کیتیناز طبیعی و جهش یافته با استفاده از نرم افزار VMD (۱۲) محاسبه شد.

مطالعات آزمایشگاهی: جهش‌زایی: پلاسمید pQE60 حاوی ژن کیتیناز(کار قبلی) (۴) بعنوان الگو برای ساخت کیتیناز جهش‌یافته G191V و S390I استفاده شد. جهش-زایی با روش QuikChange Site-Directed Mutagenesis انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمرهای جهش-زای R-G191V،F-G191V و F-S390I، R-S390I (جدول ۱) به طور جداگانه انجام شد و نتایج آن بر روی ژل آگارز مشاهده شد. سپس محصول آن با ۲-۱ واحد از *Dpn*I (Jena science) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه مورد هضم قرار گرفت و برای تأیید درستی ایجاد جهش در ژن کیتیناز، DNA پلاسمید نوترکیب توالی یابی شد.

جدول ۱.ترادف آغازگرهای به کار گرفته شده در این پژوهش

نام آغازگر	توالی آغازگر	T_a
F-G191V	5'-CATCTGCTGTACGTCTTTATCCCGATCTG- 3'	۵۸°C
R-G191V	5'-CAGATCGGGATAAAGACGTACAGCAGATG -3'	۵۸°C
F-S390I	5' -CACATCTTCCTGATGATCTACGACTTCTACG -3	۵۸°C
R-S390I	5'-CGTAGAAGTCGTAGATCATCAGGAAGATGTG -3'	۵۸°C
Emr-F	5'- ATAATCATATGGGGCGCAAATTTAATAAACC -3'	۶۲°C
Emr-R	5'- ATATACTCGAGATCTTTGAACGCCGGCGC -3'	۶۲°C

همسانه سازی (کلونینگ) و بیان: دو پرایمر برای تقویت سازی و اضافه کردن جایگاههای برش در دو طرف ژن طراحی شد. پرایمر رفت با جایگاه *Nde*I و ATG به عنوان کدون آغاز و پرایمر برگشت با جایگاه *Xho*I (جدول ۱). متعاقباً محصول PCR (۱۷۰۱ bp) درون pTZ57R/T همسانه‌سازی شد و سپس پلاسمید نوترکیب با *Nde*I و *Xho*Iبریده شد و قطعات به دست آمده (۱۷۰۱ bp) درون حامل بیانی pET26b بریده شده با همان آنزیمهای محدودکننده همسانه‌سازی شد. یک تک کلنی از پلاسمیدهای نوترکیب حامل کیتیناز جهش‌یافته که به درون *Escherichia coli* سویه BL21 (DE3) انتقال (ترانسفرم) داده شده بود در محیط کشت LB کشت داده شد. سپس بیان آن با اضافه کردن یک میلی مولار ایزوپروپیل-βD-تیوگالاکتوزید (IPTG) القاء شد و با آنالیز SDS-PAGE تأیید شد. محتوای پروتئینی عصاره‌ها با روش برادفورد (۵) تعیین شد. فعالیت کیتیناز با استفاده از کیتین کلوئیدی به عنوان سوبسترا (محلول w/v ۱ درصد کیتین کلوئیدی در بافر فسفات NaH_2PO_4 (۲۰ mM) با (pH=۷/۵) با روش روبرت و سلیترنیکوف (۱۸) برای ۶۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس واکنش به وسیله جوشاندن مخلوط در حضور DNS (Sigma , St. Louis, MO, USA)برای ۱۰ دقیقه به پایان رسانده شد. هیدرولیز کیتین با روش DNS مطابق با میلر (۱۵) اندازه گیری شد.

مطالعات کینیتیکی: محاسبه K_m و V_{max} آنزیم با استفاده از غلظتهای مختلف صفر تا ۵۰ mg/ml سوبسترای طبیعی آنزیم (کیتین کلوئیدی) و از رسم و بررسی منحنیهای میکائیلیس منتن و لینوویربرگ صورت گرفت. بدین منظور

www.SID.ir

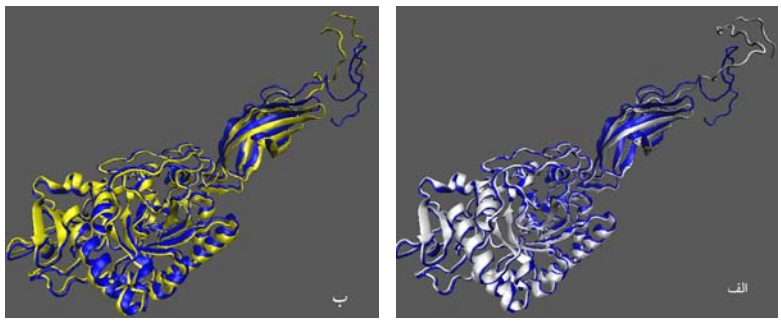
Archive of SID

فعالیت آنزیم در غلظتهای مختلف کیتین کلوئیدی در شرایط معمول با رسم منحنی استاندارد N-استیل، D-گلوکز آمین بر حسب µmol/min اندازه‌گیری شد.

بحث و نتایج

مطالعاتی که تاکنون بر روی فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز صورت گرفته است بیشتر برای بررسی نقش آمینواسیدهای آسپارتات و گلوتامات موجود در نواحی حفاظت شده دمین کاتالیتیکی (۱۱، ۱۳ و۲۰) و آمینواسیدهای آروماتیک موجود در ناحیه متصل شونده به سوبسترا می‌باشد (۲۱ و۲۳) و مطالعات کمی بر روی بررسی نقش آمینواسیدهای مجاور نواحی حفاظت شده دمین کاتالیتیکی انجام گرفته است. در این پروژه هدف بررسی نقش دو آمینواسید گلیسین ۱۹۱ و سرین ۳۹۰ مجاور نواحی حفاظت شده دمین کاتالیتیکی در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز *Serratia marcescens* B4A است.

مطالعات بیوانفورماتیکی: با بررسی نواحی محافظت شده ژن کیتیناز *S. marcescens* B4A مشاهده شد که گلیسین ۱۹۱ و سرین ۳۹۰ در نزدیکی نواحی حفاظت شده دمین کاتالیتیکی قرار گرفته‌اند و با توجه به یافته‌های گروهی از محققین درباره نقش این دو آمینواسید در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز (۱۴، ۱۷و ۲۲) این دو جایگاه گزینه مناسبی برای بررسی نقش آمینواسیدهای مجاور نواحی حفاظت شده در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز بود. برای مطالعه ساختار سه بعدی کیتیناز طبیعی و جهش‌یافته‌ها ابتدا ساختار این آنزیمها با استفاده نرم‌افزار modeler پیشگویی شد سپس کیتینازهای جهش‌یافته بر روی کیتیناز طبیعی منطبق شد. میزان RMSD (فاصله rmsd) بین اتمهای دو مولکول مربوط به کیتیناز طبیعی و جهش یافته G191V ۲/۸ آنگستروم و کیتیناز طبیعی و جهش یافته S390I ۲/۹ آنگستروم محاسبه شده است (شکل ۱) که این میزان RMSD نشان می‌دهد که جهش ایجاد شده ساختمان کلی کیتیناز را تغییر چندانی نداده و کیتینازها بر روی هم منطبق هستند.

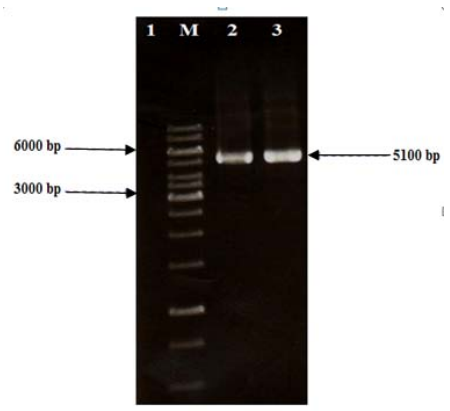


شکل ۱- نمایش کیتیناز طبیعی و جهش‌یافته‌ها با مدل انطباقی با استفاده از نرم‌افزار VMD. الف.نوار آبی رنگ کیتیناز طبیعی و نوارسفید رنگ کیتیناز جهش یافته G191V . ب.نوار آبی رنگ کیتیناز طبیعی و نوار زرد رنگ کیتیناز جهش یافته S390I را نشان می‌دهد.

مطالعات آزمایشگاهی: جهش‌زایی: پس ازطراحی پرایمرهای جهش‌زا، ژن کیتیناز با روش QuikChange Site-Directed Mutagenesis جهش داده شد و پس از انجام PCR، محصول آن بر روی ژل آگارز الکتروفورز گردید و باندbp ۵۱۰۰ مربوط به پلاسمید مشاهده شد (شکل ۲) پس از تعیین توالی ژنهای جهش‌یافته، کیفیت توالی از روی ارتفاع امواج ثبتی حاصل بررسی شد. سپس جهت اطمینان از ایجاد جهشهای مورد نظر در جایگاههای انتخاب شده، توالی حاصل با استفاده از نرم افزار BLAST در پایگاه اینترنتی NCBI، مورد بررسی قرار گرفت و همان‌طور که انتظار می‌رفت، GGC مربوط به اسیدآمینه گلیسین ۱۹۱ به GTC مربوط به اسیدآمینه والین و AGC اسیدآمینه سرین۳۹۰ به ATC مربوط به اسیدامینه ایزولوسین تبدیل شد.

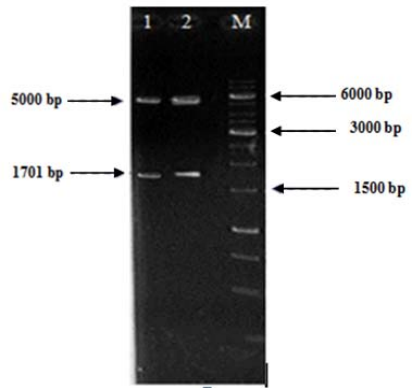
www.SID.ir

Archive of SID

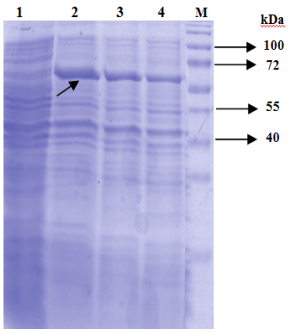


شکل ۲- الکتروفورز محصولات PCR جهش یافته. ستون ۱. کنترل منفی، ستون ۲. محصول PCR با پرایمرهای F-G191V و R-G191V، ستون ۳. محصول PCR با پرایمرهای F-S390I و R-S390I، ستون M. مارکر 1 Kb

همسانه‌سازی و بیان: ژنهای کیتیناز جهش‌یافته پس از همسانه‌سازی در حامل pTZ57RT به حامل بیانی pET26b انتقال داده شدند سپس وجود قطعه خارجی در پلاسمیدهای نوترکیب با برش آنزیمی با آنزیمهای *Xho*I و *Nde*I تأیید شد و خروج قطعه ۱۷۰۱ جفت نوکلئوتیدی از پلاسمید نوترکیب pET26b صحت همسانه‌سازی را تأیید کرد (شکل ۳). پس از انتقال (ترانسفرم) پلاسمیدهای نوترکیب حامل کیتیناز جهش یافته به درون سویه BL21 (DE3)، بیان آن با اضافه کردن ۰/۶ مولار IPTG، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پس از ۱۲ ساعت القاء شد و با آنالیز SDS-PAGE تأیید شد و پس از الکتروفورز روی ژل باند ۶۲ KDa مربوط به جهش‌یافته ها مشاهده شد (شکل ۴). فعالیت کیتیناز با استفاده از کیتین کلوئیدی به عنوان سوبسترا و در حضور DNS مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که کیتینازهای جهش‌یافته نسبت به نوع طبیعی فعالیت کمتری از خود نشان می‌دهند که این کاهش فعالیت کاتالیتیکی جهش‌یافته‌ها دلیلی بود بر اینکه گلیسین ۱۹۱ و سرین ۳۹۰ در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز نقش به سزایی داشته است (شکل ۵).



شکل ۳- الکتروفورز واکنش هضم آنزیمی جهت تأیید همسانه سازی. ستون ۱. همسانه نوترکیب حاوی ژن کیتیناز جهش یافته G191V هضم شده، ستون ۲. همسانه نوترکیب حاوی ژن کیتیناز جهش یافته S390I هضم شده و مشاهده قطعه‌هایی به طول ۱۷۰۱ جفت بازی (طول ژن کیتیناز همسانه شده) و ۵۰۰۰ جفت بازی (طول پلاسمید pET26b)، چاهک M- مارکر 1 Kb



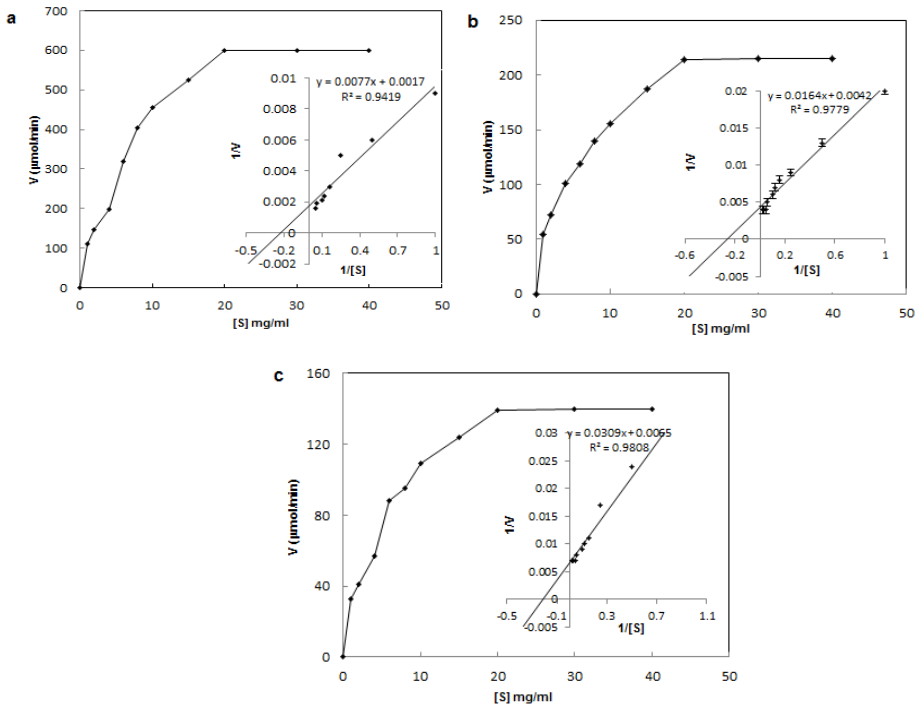
شکل ۴- بررسی بیان پروتئین کیتیناز با استفاده از ژل SDS-PAGE. ستون۱. همسانه نوترکیب قبل از القا. ستون۲. همسانه نوترکیب طبیعی. ستون ۳. همسانه نوترکیب G191V . ستون ۴. همسانه نوترکیب S390I. ستون M. مارکر وزن مولکولی پروتئین(پیکان اریب باند 62 kDa مربوط به کیتیناز است).

شکل ۵- سنجش فعالیت کیتینازهای جهش یافته و طبیعی. ویال ۱.کیتیناز طبیعی. ویال ۲. کیتیناز جهش یافته G191V. ویال ۳. کیتیناز جهش یافته S390I. ویال ۴. کنترل منفی(باکتری BL21 دارای وکتور بیانی pET26b فاقد ژن کیتیناز. ویال ۵. شاهد

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعات کینتیکی: محاسبه K_m و V_{max} آنزیمها پس از رسم و بررسی منحنیهای میکائیلیس منتن و لینوویربرگ صورت گرفت و مشاهده شد که میزان K_m برای کیتیناز طبیعی و جهش‌یافته های G191V و S390I به ترتیب برابر با ۴/۵ mg/ml و ۴ mg/ml و ۴/۷۶ mg/ml و میزان V_{max} به ترتیب برابر با ۵۸۸/۲۳ Unit(µmol/min) و ۲۳۸/۰۹ Unit(µmol/min) و ۱۵۳/۸۴ Unit(µmol/min) می باشد (نمودار ۱). K_m میزان تمایل آنزیم به سوبسترا را نشان می‌دهد نتایج حاصل از اندازه گیری K_m نشان می‌دهد که این دو آمینواسید بر تمایل اتصال آنزیم به سوبسترا تأثیر چندانی نداشته اند و V_{max} نشان دهنده حداکثر سرعت آنزیم هنگامی است که به طور کامل از سوبسترا اشباع شده است.



نمودار ۱- منحنی Michaelis-Menten. Insert; منحنی Lineweaver-Burke برای محاسبه پارامترهای کاتالیتیک. a) کیتیناز طبیعی: K_m محاسبه شده ۴/۵ mg/ml و V_{max} آن ۵۸۸/۲۳ Unit(µmol/min) می‌باشد. b) کیتیناز جهش‌یافته G191V: K_m محاسبه شده ۴ mg/ml و V_{max} آن ۲۳۸/۰۹ Unit(µmol/min) می‌باشد. c) کیتیناز جهش یافته S390I: K_m محاسبه شده برای این آنزیم ۴/۷۶ mg/ml و V_{max} آن ۱۵۳/۸۴ Unit(µmol/min) می‌باشد

نتایج حاصل از اندازه گیری V_{max} نشان می‌دهد که حداکثر سرعت فعالیت کاتالیتیکی جهش یافته‌ها نسبت به نوع طبیعی کاهش یافته و این کاهش فعالیت نقش آمینواسیدهای گلیسین و به خصوص سرین مجاور نواحی حفاظت شده دمین کاتالیتیکی را در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز نشان می‌دهد. گروهی از محققین در سال ۲۰۰۷ با ایجاد جهش در آمینواسیدهای حفاظت شده در مرکز کاتالیتیکی کیتیناز B *S. marcesscens* نقش آمینواسیدهای گلوتامات و آسپارتات را مورد بررسی قرار دادند علاوه بر آن با جهش Tyr10 و Ser93 دریافتند که هنگامی که Asp142 به سمت Glu144 هدایت می شود این دو آمینواسید بار روی Asp140 را پایدار می‌کند و باعث تغییر شبکه پیوند هیدروژنی اطراف آن می شوند (۱۷). علاوه بر آن گروهی دیگر از محققان دریافتند که در کیتینازها

www.SID.ir

Archive of SID

قطعات نامنظم انعطاف‌پذیر غنی از آمینواسیدهای پرولین، سرین، ترئونین، آلانین و گلیسین وجود دارند که به نام ارتباط‌دهنده (Linker) خوانده می‌شوند که دمین غیرکاتالیتیک متصل شونده به سوبسترا را به دمین کاتالیتیکی متصل می‌کند و شواهد نشان داده است که این ارتباط دهنده ها قطعات انعطاف پذیر و گسترده ای را ایجاد می کنند که آرایش نسبی و جهت گیری مناسب دمین متصل شونده و کاتالیتیکی را نسبت به هم تعیین می-کنند و در نتیجه سبب افزایش بازدهی کاتالیتیکی کیتینازها می‌شوند (۱۴). در این پروژه سرین ۳۹۰ به دلیل حضور داشتن در قطعه ارتباط‌دهنده و همچنین به دلیل نقش آن در پایدار کردن بار روی آسپارتات موجود در توالی حفاظت-شده نسبت به گلیسین ۱۹۱ نقش بیشتری در فعالیت کاتالیتیکی کیتیناز دارد و کاهش بیشتر فعالیت کیتیناز در نتیجه جهش سرین این موضوع را تأیید می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از صندوق حمایت پژوهشگران و فناوران کشور که با طرح شماره ۸۹۰۰۲۳۵۰ کمک به اجرای این پروژه نمودند و همچنین پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که با طرح شماره ۴۵۳ باعث فراهم ساختن شرایط اجرایی تحقیق شدند؛ سپاسگزاری می گردد.

منابع

۱- مرادی، س.، سنجریان، ف.، صفایی، ن. ۱۳۹۱. بهینه‌سازی تولید پروتوپلاست از قارچ بیماریزای گیاهی *Fusarium garminearum* به منظور تراریختی آن. مجله زیست‌شناسی ایران. ۵۰۰-۴۹۳: ۴.

۲- اصفهانی، ک.، مطلبی، م.، زمانی، م. ۱۳۹۰. طراحی و سازه‌های بیانی گیاهی جهت انتقال ژنهای chit 42 و bgn13.1 قارچ تریکودرما به صورت منفرد و توأم. مجله زیست‌شناسی ایران. ۸۹۴-۸۸۰: ۶.

3- Aronson, N. N., Jr, Halloran, B. A., Alexeyev, M. F., Zhou, X. E., Wang, Y., Meehan, E. J., & Chen, L. (2006). Mutation of a conserved tryptophan in the chitin-binding cleft of Serratia marcescens chitinase A enhances transglycosylation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *70*(1), 243–251.

4- Babashpour, S., Aminzadeh, S., Farrokhi, N., Karkhane, A., & Haghbeen, K. (2012). Characterization of a Chitinase (Chit62) from Serratia marcescens B4A and Its Efficacy as a Bioshield Against Plant Fungal Pathogens. *Biochemical Genetics*, *50*(9-10), 722–735.

5- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.

6- Brameld, K. A., Shrader, W. D., Imperiali, B., & Goddard, W. A., 3rd. (1998). Substrate assistance in the mechanism of family 18 chitinases: theoretical studies of potential intermediates and inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, *280*(5), 913–923.

7- Brurberg, M. B., Nes, I. F., & Eijsink, V. G. H. (1996). Comparative studies of chitinases A and B from Serratia marcescens. *Microbiology*, *142*(7), 1581–1589.

8- Davies G, Henrissat B.(1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, *3*(9), 853–859.

9- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. s., Eramian, D., Shen, M., Sali, A. (2002). Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. In *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc. Retrieved from http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471250953.bi0506s15/abstract

10- Gåseidnes, S., Synstad, B., Jia, X., Kjellesvik, H., Vriend, G., & Eijsink, V. G. H. (2003). Stabilization of a chitinase from Serratia marcescens by Gly→Ala and Xxx→Pro mutations. *Protein Engineering*, *16*(11), 841–846.

11- Hashimoto, M., Honda, Y., Nikaidou, N., Fukamizo, T., & Watanabe, T. (2000). Site-directed mutagenesis of Asp280 suggests substrate-assisted catalysis of chitinase A1 from Bacillus circulans WL-12. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *89*(1), 100–102.

www.SID.ir

Archive of SID

12- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38.

13- Lin, F. P., Chen, H. C., & Lin, C. S. (1999). Site-directed mutagenesis of Asp313, Glu315, and Asp391 residues in chitinase of Aeromonas caviae. *IUBMB Life*, *48*(2), 199–204.

14- Lobo, M. D. P., Silva, F. D. A., Landim, P. G. C., Cruz, P. R. da, Brito, T. L. de, Medeiros, S. C. de, … Grangeiro, T. B. (2013). Expression and efficient secretion of a functional chitinase from Chromobacterium violaceum in Escherichia coli. *BMC Biotechnology*, *13*(1), 46.

15- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426–428.

16- Robertus, J. D., & Monzingo, A. F. (1999). The structure and action of chitinases. *EXS*, *87*, 125–135.

17- Synstad, B., Gåseidnes, S., Van Aalten, D. M. F., Vriend, G., Nielsen, J. E., & Eijsink, V. G. H. (2004). Mutational and computational analysis of the role of conserved residues in the active site of a family 18 chitinase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *271*(2), 253–262.

18- Takiguchi Y (1991) Physical properties of chitinous materials. Advanc Chitin Sci 111:1–7

19- Tsuji, H., Nishimura, S., Inui, T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura, T., & Uegaki, K. (2010). Kinetic and crystallographic analyses of the catalytic domain of chitinase from Pyrococcus furiosus- the role of conserved residues in the active site. The FEBS Journal, 277(12), 2683–2695.

20- Tsujibo, H., Orikoshi, H., Imada, C., Okami, Y., Miyamoto, K., & Inamori, Y. (1993). Site-directed mutagenesis of chitinase from Alteromonas sp. strain O-7. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *57*(8), 1396–1397.

21- Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N., Nonaka, T., Sugiyama, J., & Watanabe, T. (2001). Roles of the exposed aromatic residues in crystalline chitin hydrolysis by chitinase A from Serratia marcescens 2170. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(44), 41343–41349.

22- Van Damme, E. J. M., Culerrier, R., Barre, A., Alvarez, R., Rouge, P., & Peumans, W. J. (2007). A Novel Family of Lectins Evolutionarily Related to Class V Chitinases: An Example of Neofunctionalization in Legumes. *Plant Physiology*, *144*(2), 662–672.

23- Zhang, H., Huang, X., Fukamizo, T., Muthukrishnan, S., & Kramer, K. J. (2002). Site-directed mutagenesis and functional analysis of an active site tryptophan of insect chitinase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *32*(11), 1477–1488.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of active site adjacent residues on *Serratia marcescens* B4A chitinase catalytic activity

Emruzi Tubkanlu Z.[1], Aminzadeh S.[1], Karkhanei A.A.[1] and Alikhajeh J.[2]

[1] **Industrial and Environmental Biotechnology Dept. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Chemistry Dept., City College of New York, New York, USA**

Abstract

Chitinases are one of the important industrial enzymes which have significant role in different industries such as digestion of chitin and chitoligosaccharides, bioremediation and control of plants pathogenic fungal as well as insects. This enzyme catalyzes the β 1→6 glycoside bond and then hydrolyses chitin polymers. chitinases consists of a $(ß/α)_8$-barrel catalytic domain contain of conserved sequence called DXDXE motif on $β_4$ strand which D, E and residue around of this conserved sequence have essential role in cleavage and hydrolysis of the glycosidic bond. Study of active site adjacent amino acids can help us to understand their function in catalytic properties. In this project are mutated Ser390 and Gly191 for investigating role of this two residue existing in the adjacent of conserved sequence at catalytically process of *Serratia marcescens* B4A chitinase and after of cloning in expression vector and analysis of expression with SDS-PAGE are investigated effect of two mutations on the enzyme activity.

Key words: Chitinase, chitin, glycoside bond, *Serratia marcescens* B4A

www.SID.ir